

REC'D 17 APR 2004

PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0076416
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 10월 30일
Date of Application OCT 30, 2003

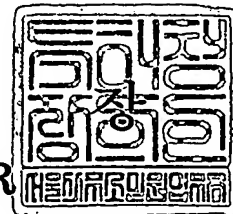
출원 인 : 학교법인 인재학원
Applicant(s) INJE UNIVERSITY



2004 년 03 월 12 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OF PCT

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.10.30
【발명의 명칭】	HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 사멸을 유도시키는 방법 및 이 방법을 이용하여 세포사멸 억제 물질 및 유전자를 탐색하는 방법
【발명의 영문명칭】	METHOD FOR INDUCING THE COMPLETE APOPTOSIS OF LIVER CELLS EXPRESSING PROTEIN HBx AND SCREENING DRUG AND GENE FOR INHIBITING THE APOPTOSIS
【출원인】	
【명칭】	학교법인 인제학원
【출원인코드】	2-1999-052343-1
【대리인】	
【성명】	오규환
【대리인코드】	9-1998-000435-1
【포괄위임등록번호】	2003-074482-7
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2003-074481-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김연수
【성명의 영문표기】	KIM, Yeon-Soo
【주민등록번호】	590710-1042218
【우편번호】	137-780
【주소】	서울특별시 서초구 서초4동 1687 번지 유원아파트 101동 1607호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이수경
【성명의 영문표기】	LEE, Sukyung
【주민등록번호】	731228-2041822

【우편번호】	135-905
【주소】	서울특별시 강남구 압구정1동 현대아파트 84동 303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	황정미
【성명의 영문표기】	HWANG, Jung Me
【주민등록번호】	740405-2453211
【우편번호】	305-503
【주소】	대전광역시 유성구 송강동 그리아파트 309동 1202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이영관
【성명의 영문표기】	LEE, Young-Kwan
【주민등록번호】	701203-1496318
【우편번호】	305-729
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 청구나래 아파트 110동 1004호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조혜성
【성명의 영문표기】	CHO, Hyeseong
【주민등록번호】	570617-2235011
【우편번호】	442-190
【주소】	경기도 수원시 팔달구 우만동 현대아파트 15동 503호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권기선
【성명의 영문표기】	KWON, Ki-Sun
【주민등록번호】	590103-1010811
【우편번호】	305-333
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 99번지 한빛아파트 130동 1306호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

오규환 (인) 대리인

장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 5 면 5,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 9 항 397,000 원

【합계】 431,000 원

【감면사유】 학교

【감면후 수수료】 215,500 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)의 유전자 중 간암 유발 인자로 알려진 X 유전자(HBx)가 발현되는 간세포의 사멸을 세포 배양 상에서 유도시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 NF- κ B 억제제를 처리하는 방법을 이용하여 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 사멸을 유도시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 간세포의 완전한 세포사멸 유도방법을 이용함으로써 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질 및 유전자를 탐색할 수 있으므로, 본 발명에 따른 방법은 간염 치료제를 개발하는데 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】세포사멸, B형 간염 바이러스, HBx 단백질, NF- κ B 억제제

【명세서】

【발명의 명칭】

HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 사멸을 유도시키는 방법 및 이 방법을 이용하여 세포사멸 억제 물질 및 유전자를 탐색하는 방법{METHOD FOR INDUCING THE COMPLETE APOPTOSIS OF LIVER CELLS EXPRESSING PROTEIN HBx AND SCREENING DRUG AND GENE FOR INHIBITING THE APOPTOSIS}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 인간 간 세포주 Chang V9 및 Chang X31에서 HBx 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과이다.

도 2는 설파살라진을 농도별로 처리한 후 120시간이 경과했을 때의 인간 간 세포주 Chang V9과 Chang X31의 세포생존율에 관한 그래프(A) 및 세포형태를 확인한 사진(B)이다.

도 3은 설파살라진 1.3mM 처리 후 72시간이 경과하였을 때의 인간 간세포주 Chang V9 및 Chang X31을 DAPI 염색한 결과이다.

도 4는 설파살라진 1.3mM 처리 후 120시간이 경과했을 때의 인간 간 세포주 Chang X31의 세포콜로니를 크리스탈 바이올렛으로 염색한 사진으로 각각 설파살라진의 비처리(No treatment), 스타우로스포린(STS), 글루타티온(GSH) 및 NAC을 처리한 사진이다.

도 5는 GP293에서의 유전자 도입 효율과 Chang X31 세포주에서의 레트로바이러스 역가를 X-gal 염색으로 확인한 결과이다.

도 6은 설파살라진 1.3mM 처리 후 120시간이 경과했을 때의 인간 간 세포주 Chang X31의 세포콜로니를 크리스탈 바이올렛으로 염색한 사진으로 설파살라진 처리 이전에 항산화 유전자 (pMYK-eGFP, GPx, PrxII 및 PrxIII)를 형질도입시켜 Chang X31의 세포사멸 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 7은 Chang X31 세포주에 항산화유전자 페록시레독신 II(PrxII)를 형질도입하여 발현시킨 뒤 웨스턴 블롯팅으로 발현여부를 확인한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

8> 본 발명은 B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)의 유전자 중 간암 유발 인자로 알려진 X 유전자(HBx)가 발현되는 간세포의 사멸을 세포 배양 상에서 유도시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 NF- κ B 억제제를 처리하여 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 사멸을 유도시키는 방법에 관한 것이다.

9> 지금까지 보고된 바이러스성 B형 간염 및 간암의 발생기전을 종합해 보면, 바이러스가 감염되면 간세포의 사멸로 인해 간염(Hepatitis)이 발생되고, 이중 일부의 간세포가 사멸기전으로부터 회피하게 되면 간암(liver cancer)으로 발전할 수 있다고 추정된다(Chisari, *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.*, 206, 149-173, 1996).

- 10> 바이러스성 간염 및 간암은 한국인에게 가장 많이 발생하는 질환으로 간암을 치료하기 위한 여러 연구가 시도되고 있다. 간암의 주요 인자인 B형 간염 바이러스는 HBs, HBc, HBx 및 중합효소의 4개의 단백질로 구성되며, 그 중 HBx 단백질이 바이러스성 간염, 간경변 및 간암의 주요 유발인자로 알려져 있다. HBx 단백질이 세포사멸, 세포사멸 억제 및 세포성장 증진을 직접 또는 간접적으로 조절하고 있으며, 세포사멸을 유도하는 물질에 대해 과민화 반응을 일으킨다고 보고되었다(Su 및 Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8744-8749, 1997). 또한 HBx 유전자로 형질전환시킨 쥐에서 간암이 유발된다는 보고가 있다.
- 11> HBx 단백질에 의해 유도되는 간세포의 사멸 현상은 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 의한 염증 반응을 통해 일어나는 것으로 알려져 있다(Su 및 Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8744-8749, 1997). 또한, 간세포에서 HBx 단백질이 TNF- α 에 의한 세포사멸을 촉진시킨다는 보고도 있다(Chisari, *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.*, 206, 149-173, 1996). 이는 HBx 단백질이 TNF- α 의 양을 직접 또는 간접적으로 증가시키거나, TNF- α 에 의한 세포사멸로 이르는 신호 전달의 중간 매개체를 조절함으로써 일어난다.
- 12> TNF- α 는 HBx 단백질에 의한 세포 내 신호전달 조절과 관련된 대표적인 사이토카인으로, TNF- α 의 신호전달은 세포사멸, 세포증식, 분화 및 생존으로 가는 다양한 신호 전달 과정에 관여한다. 우선, TNF- α 가 TNF- α 수용체 I(TNFR I)과 결합할 경우, 캐스페이즈(caspase)를 활성화시키는 전형적인 세포 사멸 과정을 거치게 된다. 반면, TNF- α 수용체 II(TNFR II)와 결합할 경우, 전사인자인 NF- κ B(nuclear factor kappa B)를 활성화시키면서 세포생존을 촉진하게 된다.
- 3> 일반적으로 NF- κ B는 I κ B와 복합체를 이루어 비활성 상태로 세포질에 존재하다가 TNF- α 와 같은 사이토카인에 의한 세포 신호 전달에 의해 I κ B가 인산화되어 분해되면서 I κ B로부

터 분리되어 활성화된다. 결국, 활성상태의 NF- κ B는 핵으로 이동하여 세포 주기 조절과 관련된 유전자들의 프로모터/인핸서(enhancer) 부위에 결합, 유전자 발현을 활성화시킨다. NF- κ B 억제제인 설파살라진(sulfasalazine)은 I κ B의 인산화를 억제하여 NF- κ B의 활성화를 차단하게 된다. 이에 설파살라진은 강력한 NF- κ B의 특이적 억제제로 사용되고 있다(Wahl 등, , 101(5), 1163-1174, 1998).

14> HBx 단백질과 관련된 TNF- α 에 의한 세포생존 및 세포사멸을 조절하는 신호 전달 체계에서, HBx 단백질은 상황에 따라 NF- κ B의 활성을 촉진하거나 억제하여 세포사멸을 조절할 수 있다(Su 등, *J. virol.*, 75, 215-225, 2001; Su 및 Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8744-8749, 1997).

15> 본 발명자들은 상기와 같은 HBx 단백질의 특성을 고려하여, NF- κ B의 활성을 억제하여 세포생존의 경로를 차단시켜 HBx가 발현되는 간세포를 완전히 사멸시키는 조건을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

6> 본 발명의 목적은 세포생존에 관여하는 전사인자인 NF- κ B 억제제를 처리하여 세포생존 경로를 차단하는 방법으로 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 사멸을 유도시키는 방법을 제공하는 것이다.

7> 본 발명의 다른 목적은 상기 세포사멸 유도 방법을 이용하여 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸을 억제하는 약물 및 유전자를 탐색하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 18> 상기 목적에 따라, 본 발명은 NF- κ B 억제제를 처리하는 것을 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 세포사멸을 유도하는 방법을 제공한다.
- 19> 상기 다른 목적에 따라, 본 발명은 HBx 단백질을 발현하는 간세포에 NF- κ B 억제제를 처리하기 이전 또는 이후에 시험 물질을 처리하는 것을 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질을 탐색하는 방법, 및 HBx 단백질을 발현하는 간세포에 시험 유전자를 형질도입한 후 NF- κ B 억제제를 처리하는 것을 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 유전자를 탐색하는 방법을 제공한다.
- 20> 본 발명에서의 "완전한 세포사멸"이란 세포사멸이 100% 이루어지는 것을 의미한다.
- 21> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- 22> 먼저, B형 간염 바이러스 유전자 산물 중 간암 유발의 주인자로 알려진 HBx 단백질을 발현하는 세포주를 확립하기 위하여, HBx 유전자를 포함하는 벡터를 인간 간 세포주인 창 세포(Chang cell)에 도입한 뒤, 클론의 단백질을 분리하고 웨스턴 블롯팅을 수행하여 간암 유발 인자 HBx 단백질이 발현하는 것을 확인하여 HBx 단백질을 영구적으로 발현하는 클론을 선별한다.
- 23> 본 발명에서는 상기 방법으로 HBx 단백질을 영구적으로 발현하는 바이러스성 간 세포주를 확립하여 이를 Chang X31이라 명명하고, HBx 유전자를 포함하지 않는 벡터만 도입된 대조 세포주를 Chang V9이라 명명하였다.
- 24> HBx 단백질을 발현하는 간세포에서 HBx 단백질은 TNF- α 의 발현을 촉진시키고 이를 통하여 세포 내 유해 활성 산소가 증가되어 세포사멸이 유도된다. HBx 단백질에 의해 TNF- α 의 양

이 증가되면 세포사멸에 대한 민감화를 나타낸다(Su 및 Schneider, , 94, 8744-8749, 1997). 그러나 TNF- α 는 활성 산소를 증가시킬 뿐만 아니라, 동시에 전사인자인 NF- κ B의 활성을 증가시켜 세포생존을 촉진하기도 한다. 즉, HBx 단백질에 의해 그 발현이 촉진되는 TNF- α 는 세포사멸 및 세포생존이라는 상반된 두 가지 신호전달을 매개시키는 역할을 한다.

- 25> 본 발명자들은 HBx 단백질을 발현하는 세포주에 TNF- α 를 처리하여 세포사멸을 관찰하였는데, 높은 농도의 TNF- α 를 처리한 경우에도 세포사멸은 관찰되지 않았다. 이는 TNF- α 가 세포사멸 및 세포생존에 모두 관여함을 뒷받침하며, 결과적으로 TNF- α 단독으로는 완전한 세포사멸을 유도시키는 데에는 부적합함을 확인하였다.
- 26> 따라서, HBx 단백질을 발현하는 간세포를 완전한 사멸로 유도하기 위해서는 TNF- α 에 의한 세포생존 유발 신호전달을 억제시키는 물질의 처리가 요구된다.
- 27> 이에 따라, 본 발명에서는 세포생존 신호전달에 관여되는 전사인자인 NF- κ B를 효과적으로 저해하는 NF- κ B 저해제를 처리하여 세포사멸을 보다 효과적으로 유도함으로써 HBx 단백질을 발현하는 간세포를 완전한 사멸로 유도하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, NF- κ B 저해제로 설파살라진을 사용한다.
- 28> "NF- κ B 저해제"는 유전자의 전사활성에 관여하는 NF- κ B 인자의 활성을 저해하는 물질을 지칭하는 것으로서, 구체적으로, 설파살라진(sulfasalazine)(Wahl 등, *J. Clin. Invest.*, 101(5), 1163-1174, 1998, Cavallini et al., *Biochem Pharmacol*, 62(1), 141-147, 2001), 산기나린(Sanguinarine)(Chaturvedi et al., *J. Biol. Chem.*, 272(48), 30129 -30134, 1997), 올레안드린(Oleandrin)(Manna et al., *Cancer. Res.* 60(14), 3838-3847, 2000), 살리실레이트(Salicylate)(Yin et al., *Nature*, 396(6706), 77-80 1998, Cavallini et al., *Biochem. Pharmacol.*, 62(1), 141-147, 2001, Kopp et al., *Science*, 265(5174), 956-959, 1994), 메살

라진(Mesalazine)(Bantel et al., *Am. J. Gastroenterol.* 95(12), 3343-3345), 아스피린 (Aspirine)(Yin et al., *Nature*, 396(6706), 77-80, 1998, Kopp et al., *Science* 265(5174), 956-959, 1994), 메토틱렉세이트(Methotrexate)(Majumdar *J. Immunol.*, 167(5), 2911-2920, 2001) 등의 물질들이 NF- κ B 저해제로서 알려져 있다.

- 19> 본 발명에서는 B형 간염 바이러스의 유전자 중 간암 유발 인자로 알려진 HBx 유전자가 발현되는 세포에, 강력한 NF- κ B 특이 억제제인 설파살라진의 농도를 달리하여 처리함으로써 세포 배양상에서 유도되는 완전한 세포사멸의 조건을 확립하였다. 이는 HBx 단백질을 발현하지 않는 간세포에서는 세포사멸이 유도되지 않고, HBx 단백질을 발현하는 간세포에서만 완전한 세포사멸이 유도되는 조건을 말한다.
- 0> 구체적으로, 본 발명에서는 HBx 단백질을 발현하는 간세포에 설파살라진을 처리하고 120 시간 후에 완전한 세포사멸을 유도할 수 있는 조건을 확립하였다. 이는 본 발명의 일태양인 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질 및 유전자를 탐색하기 위해서는 대상 물질 및 유전자를 도입시킨 후 세포내에서 활성화될 시간적 여유가 요구되기 때문이다.
- 1> 이러한 완전한 세포사멸의 조건을 확립하기 위해서 각기 다른 농도의 설파살라진을 Chang X31 및 Chang V9 세포주에 처리한 뒤, 배양 플레이트 상에 살아 남아있는 세포수를 세어서 이들의 세포 생존율을 측정하였다.
- > 그 결과, 설파살라진 1.3mM 농도의 세포 배양조건에서 HBx 단백질을 발현하는 Chang X 31 간세포의 완전한 세포사멸이 유도되고 대조군인 Chang V9 세포에서는 세포사멸이 유도되지 않음을 확인하였다.

<33> NF- κ B 억제제인 설파살라진으로 HBx 간세포주의 완전한 세포사멸을 유도하는 조건을 확립하기 위하여 설파살라진 농도를 1.0mM, 1.3mM, 1.5mM, 1.7mM, 2.0mM 까지 다양하게 처리한 후 Chang X31 및 Chang V9의 세포 생존율을 관찰하였다. 120시간 후 세포관찰 결과 1.0mM 설파살라진 처리군 내의 대조군 Chang V9에서는 세포사멸이 전혀 유도되지 않음과 동시에 Chang X31에서의 세포사멸 또한 30% 정도로 효율적이지 못하였다. 1.3mM 농도 처리군에서는 Chang X31 세포주에서 완전한 세포사멸이 일어남과 동시에 Chang V9 세포주에서는 약 10% 이내의 미미한 수준의 세포사멸만이 관찰되었다. 1.5mM 농도 이상의 처리군에서는 Chang X31과 더불어 Chang V9에서도 설파살라진의 농도와 비례하여 20% 이상의 세포사멸이 진행됨이 관찰되었다(도 2 참조).

<34> 본 발명의 일실시예에서는 세포사멸시 관찰되는 형태학적 특징을 DAPI 염색방법으로 확인하였다. DAPI 염색이란 세포를 고정액으로 고정한 후, DAPI 염색액으로 암실에서 일정시간 세포를 염색 반응시키고 형광 현미경을 통해 세포사멸시 전형적으로 나타나는 세포핵 응축, 조그라듬, 알알이 깨짐(fragmentation) 등의 현상을 관찰함으로써 세포사멸을 확인할 수 있는 방법이다. 그 결과, Chang V9 세포주에서와는 달리 Chang X31에서만 세포사멸이 일어남을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

<35> 한편, 본 발명은 상기에서 확립된 세포사멸 유도 방법을 이용하여 HBx 단백질이 발현되는 간세포에서 일어나는 세포사멸을 억제하는 물질을 탐색하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 1) HBx 단백질을 발현하는 간세포의 배양 배지에 NF- κ B 억제제를 처리하기 이전 또는 이후에 간세포의 세포사멸 억제 후보 물질을 처리하는 단계; 및 2) 세포사멸의 억제 여부를 확인하는

단계를 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸을 억제하는 물질을 탐색하는 방법을 제공한다. 상기 단계 1)의 NF- κ B 억제제는 설파살라진인 것이 바람직하다.

<36> 상기에서 확립된 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸 유도 조건배양에서 세포사멸을 억제할 것이라고 추측되는 후보 물질을 첨가하여 세포사멸이 억제된다면, 이 물질은 HBx 단백질이 발현하는 간세포의 세포사멸을 억제하는 기능을 하는 것으로 추정할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸 억제제로의 활성을 탐색하는 방법은 B형 간염 바이러스에 의한 간염 등을 치료하는 약물을 탐색하는 데 이용될 수 있다.

37> 상기와 같은 방법에 의해 세포사멸을 억제하는 것으로 확인된 물질은 그 물질을 활성 성분으로 포함하는 간염 치료제로 이용될 수 있다.

38> 또한, 본 발명은 상기에서 확립된 세포사멸 유도 방법을 이용하여 HBx 단백질이 발현되는 간세포의 사멸을 억제하는 유전자를 탐색하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 1) HBx 단백질을 발현하는 간세포에 후보 유전자를 도입하는 단계; 2) 1)에서 얻은 세포의 배양 배지에 NF- κ B 억제제를 처리하는 단계; 및 3) 세포사멸의 억제 여부를 확인하는 단계를 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸을 억제하는 유전자를 탐색하는 방법을 제공한다.

9> 상기 단계 1)에서 HBx 단백질을 발현하는 간세포에 후보 유전자를 도입하는 방법은 레트로바이러스 cDNA 라이브러리로 감염시키거나 유전자 발현 벡터를 형질도입시키는 방법으로 수행될 수 있고, 단계 2)에서 NF- κ B 억제제는 설파살라진인 것이 바람직하다.

1> 본 발명의 실시예에서는 레트로바이러스 cDNA 라이브러리 벡터를 이용하여

유전자의 발현을 탐색할 수 있는지 살펴보기 위해, 레트로바이러스 벡터에 대한 본 발명에 따른 HBx 단백질을 발현하는 세포주 Chang X31의 역가(titer)를 조사하였다. 그 결과, Chang X31 세포주를 대상 세포주로 사용할 때 1×10^4 cfu/ml 이상 역가의 레트로바이러스가 감염됨을 확인하였고, 이로부터 레트로바이러스 cDNA 라이브러리를 본 발명에 이용할 수 있다는 것을 확인하였다.

<41> 또한, 발현벡터를 이용하는 경우에는, 탐색하려는 유전자를 포함하는 벡터를 리포솜이나 인산칼슘을 이용한 방법 등의 통상적인 형질도입법에 의해 HBx 단백질을 발현하는 세포에 도입할 수 있다.

<42> 즉, 상기 방법에 의해 탐색하려는 후보 유전자를 Chang X31 세포주에 도입시키는데, 후보 유전자가 간세포의 세포사멸을 억제한다면 간세포의 완전한 세포사멸 유도 조건에서도 살아남을 것이기 때문에, 세포사멸이 일어나는지 여부에 따라 후보 유전자가 세포사멸을 억제하는 유전자인지 여부를 조사하는 시스템을 구축할 수 있다. 따라서 이 시스템은 B형 간염 바이러스에 의한 간염 등을 치료하는 유전자를 탐색하는 데 이용될 수 있다.

<43> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

<44> <실시예 1> HBx 단백질을 발현하는 인간 간 세포주(Chang X31) 확립

- <45> B형 간염 바이러스 단백질 중 간암 유발 인자로 알려진 HBx 유전자 및 HBx 단백질에 표지되는 HA 유전자를 포함하는 벡터 pTetX(Kim et. al., *J. Bio. Chem.*, 273, 381-385, 1998) 및 HBx 유전자 및 HA 유전자를 포함하지 않는 벡터 pTRE(Clontech사, 미국)를 각각 인간 간 세포주인 창 세포(Chang cell, ATCC CCL-13, 미국)에 인산 칼슘 방법(profection mammalian transfection system, Promega사, 미국)에 따라 형질도입하였다. 형질도입 24시간 후 세포를 계대배양하고 400 μ g/ml 농도의 G418(Invitrogen사, 미국)을 첨가하여 3주간 유지하여 HBx 유전자가 도입된 세포를 선별하였다. 상기 방법으로 HBx 단백질을 영구적으로 발현하는 인간 간 세포주를 확립하여 이를 Chang X31이라 명명하고, HBx 유전자를 포함하지 않는 벡터만 도입된 대조 세포주를 Chang V9이라 명명하였다.
- <46> 웨스턴 블롯팅 방법을 이용하여 형질도입시킨 창 세포에서의 HBx 유전자 발현을 확인하였다. Chang X31 및 Chang V9 세포주 접종 48시간 후 스크래퍼를 사용하여 세포들을 수확하여 샘플을 준비한 후 전기영동하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 이때 1차 단일 클론 항체로는 HA 항체(Clontech, 미국)를 1:1,000의 비율로 희석하여 하루 동안 반응시켰고, 2차항체로는 1:1,000으로 희석한 항 토끼 이차 항체(Bio.Rad사, 미국)로 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 ECL 시스템(Enhanced chemiluminescent) 키트(Amersham사, 미국)를 이용하여 발광반응을 시키고 엑스선 필름(Kodak사, 독일)에 감광하여 X 단백질 발현 여부를 확인하였다.
- <47> 그 결과, HBx 유전자를 포함하는 벡터로 형질도입시킨 창 세포(Chang X31)에서는 HBx 단백질로 확인되는 밴드가 확인되는 반면, HBx 유전자를 포함하지 않는 벡터로 형질도입시킨 창 세포(Chang V9)는 어떠한 밴드도 확인되지 않았다(도 1 참조). 즉, HBx 단백질을 영구적으로 발현하는 인간 간세포주 Chang X31을 수립하였다.

<48> <실시에 2> HBx 단백질을 발현하는 인간 간 세포주의 완전한 세포사멸 조건 확립

<49> 본 발명에서는 NF- κ B 활성 억제제인 설파살라진을 처리하여 TNF- α 에 의한 세포생존경로를 차단함으로써 HBx 단백질을 발현하는 인간 간 세포주의 완전한 세포사멸 조건을 확립하였다.

<50> 세포주의 성장속도 차이를 감안하여 6-웰 플레이트에 Chang X31 세포주는 1×10^5 개, Chang V9 세포주는 0.8×10^5 개의 세포를 각각 접종하고, 세포 밀도가 60%정도로 성장한 접종 48시간째에 1.0mM, 1.3mM, 1.5mM, 1.7mM, 2.0mM 농도의 설파살라진을 각각 첨가하였다. 설파살라진 처리 48시간째에 새로운 배지로 교환하면서 동일 농도의 설파살라진을 재첨가하였다. 설파살라진 재첨가 3일 후, 즉, 설파살라진 처리 120시간 후의 세포사멸 관찰결과, 1.0mM 설파살라진 처리군에서는 Chang V9과 더불어 Chang X31에서도 세포가 50% 이상으로 생존하였으며, 1.3mM 설파살라진을 처리군에서는 Chang V9 세포주의 세포사멸은 10%의 미미한 수준으로 관찰되었고, Chang X31 세포주에서만 100% 세포사멸이 유도되는 것이 관찰되었다. 1.5mM 농도 처리군에서부터는 대조군인 Chang V9 세포주에서도 설파살라진 농도에 비례하여 세포사멸이 20% 이상으로 진행됨이 관찰되었다(도 2A 참조).

51> 따라서, 설파살라진을 처리하여 Chang X31 세포주에서 120시간 이내에 걸쳐 세포사멸을 유도하기 위해서는, 1.3mM 이상의 설파살라진을 처리해야 하는 세포사멸 조건을 확립하였다.

52> <실시에 3> 인간 간 세포주(Chang X31)의 완전한 세포사멸의 형태학적 확인

53> HBx 발현 인간 간 세포주(Chang X31)의 세포사멸을 형태학적으로 확인하기 위한 방법으로 세포핵 관찰이 가능한 DAPI 염색을 수행하였다. Chang X31과 Chang V9 세포주를 각각 6-웰

플레이트에 접종하고 48시간 후 1.3mM의 설파살라진을 처리하였다. 세포사멸이 완전히 이루어지는 120시간 후에는 형태학적 확인이 불가능하므로 이점을 감안하여 세포사멸이 진행되는 도중인 설파살라진 처리 72시간 후 DAPI 염색을 수행하였다. 세포를 고정액(1% 포름알데히드, 0.2% 글루타르알데히드)에 5분간 방치한 후 인산 완충 용액으로 2회 세척하고 인산 완충 용액에 1mg/ml로 희석된 DAPI 염색액(Sigma사, 미국)을 첨가하였다. 이 후 세포는 암실상태를 유지시켜 주면서 실온에서 5시간 동안 DAPI 염색을 진행하였다. 형광 현미경을 통해 세포핵의 DAPI 염색 관찰 결과 Chang V9 세포주에서와 달리 Chang X31에서만 세포사멸시 전형적으로 관찰되는 세포핵 응축, 쪼그라듐, 알알이 깨짐 (fragmentation) 현상이 관찰되었다(도 3 참조).

<54> <실시예 4> HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질의 탐색

<55> Chang X31 세포 1×10^5 개를 6-웰 플레이트에 접종하고 48시간째에, 항산화제인 글루타티온 (Glutathione, GSH)(Sigma사, 미국) 2mM, NAC (N-아세틸-L-시스테인)(Sigma사, 미국) 1mM를 각각 첨가한 실험군과, 단백질 합성 억제제인 스타우로스포르린(Staurosporine, STS)(Sigma사, 미국) 0.5mM를 첨가한 실험군, 그리고, 아무처리도 하지 않은 대조군에, 각각 1.3mM의 설파살라진을 첨가하고, 120시간후에 세포 콜로니 형성여부를 관찰하였다.

<56> 그 결과, 아무처리도 하지 않은 대조군과 단백질 합성 억제제인 STS 0.5mM을 처리한 실험군에서는 100% 세포사멸이 관찰된 반면, 글루타티온 및 NAC를 처리한 실험군에서는 세포사멸이 부분적으로 억제되어 세포 콜로니가 형성되는 것이 관찰되었다. 형성된 세포콜로니에 대해 0.5% 크리스탈 바이올렛(소화화학, 동경, 일본)으로 콜로니 염색을 수행하여 콜로니 형성정도를 확인하였다(도 4 참조).

- {57> 이를 통해 글루타티온 및 NAC와 같은 항산화제는 간 세포주의 세포사멸을 억제하는 활성을 가지나, 스타우로스포린과 같은 단백질 합성 억제제는 세포사멸을 억제하는 활성을 가지지 않음을 확인하였다.
- {58> <실시예 5> HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 유전자의 탐색
- {59> <5-1> 레트로바이러스 cDNA 라이브러리 벡터의 이용가능성 확인
- {60> Chang X31 세포주의 사멸을 억제하는 유전자를 탐색하는 데에 레트로바이러스 cDNA 라이브러리 벡터를 이용할 수 있는지 확인하기 위하여 레트로바이러스 라이브러리의 역가를 조사하였다. 이를 위하여 lacZ 유전자를 발현하는 리포터 레트로바이러스 벡터인 MFG/lacZ/puro(Oh et al., *Mol. Cells* 11(2), 192-197, 2001, 한양대 의대 미생물학교실 정희용 박사로부터 입수)를 이용하여 다음과 같이 실시하였다.
- {61> 6-웰 플레이트에 레트로바이러스 포장 세포주 GP293 세포(clontech사, 미국) 8×10^5 개를 접종한 후, 24시간 후 리포펙타민 플러스(lipofectamine Plus, invitrogen사, 미국)를 사용하여 MFG/LacZ/puro $0.5 \mu\text{g}$ 과 소포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus, VSV)의 외피 당단백질 발현벡터(pHCMV-G)(Aiken C., *J. Virol.* 71(8), 5871-5877, 1997) $0.5 \mu\text{g}$ 을 형질도입시켰다.
- {62> 형질도입 48시간 후에 바이러스가 포함된 세포 배양액을 수거하여, 하루 전에 2×10^5 개를 접종한 Chang X31 세포주에 감염시켰다. 37°C 에서 48시간 배양한 후, lacZ 유전자가 감염된 Chang X31 세포를 고정액(1% 포름알데히드, 0.2% 글루타르알데히드)으로 5분간 고정시키고 인

산 완충 용액으로 2회 세척하여 고정액을 제거한 후, 염색액(4mM potassium ferrocyanide, 2mM 염화마그네슘, 0.625mg/ml X-gal)을 첨가하여 15시간 동안 X-gal염색을 수행하였다.

63> 레트로바이러스 라이브러리의 Chang X31 세포주에 대한 역가는 필드(field)가 그려진 플레이트에서 한 필드에 베타-갈락토시다제(β -galactosidase)에 염색된 세포수를 센 후, 전체 lacZ 유전자의 감염된 세포수를 결정하였다. Chang X31 세포주를 대상 세포주로 사용할 때 1×10^4 cfu/ml 이상 역가의 재조합 레트로바이러스가 감염됨을 확인하였다(도 5 참조).

64> 이는 Chang X31 세포주를 대상으로 레트로바이러스 cDNA 라이브러리 벡터를 이용한 유전자 탐색 시스템을 사용할 수 있음을 의미한다.

65> <5-2> 발현벡터를 이용한 유전자 탐색(항산화 유전자 도입에 의한 간 세포주의 세포사멸 억제 관찰)

66> 포유류 발현 벡터인 pCMV/myg/cyto(Invitrogen사, 미국)에 항산화 유전자인 글루타티온 페록시다제(Glutathione peroxidase; GPx), 페록시레독신 II(Peroxyredoxin II; PrxII) 및 페록시레독신 III(Peroxyredoxin III; PrxIII)를 각각 도입한 발현벡터를 제조하였다.

67> 구체적으로, 상기 PrxII 발현벡터로는 pCMV/myc/cyto-Prx II(Kang et al., J. Biol. Chem. 273, 6297-6302(1998))를 이용하였고, PrxIII 발현벡터로는 pCMV/myc/cyto-Prx III(Kang et al., J. Biol. Chem. 273, 6297-6302(1998))를 이용하였다.

68> Chang X31을 6-웰 플레이트에 1.5×10^5 세포수로 접종하고 24시간 후, GPx 발현벡터, PrxII 발현벡터 및 PrxIII 발현벡터와 항산화 유전자를 발현하지 않는 대조 벡터 pMYK-eGFP를 각각 $2\mu\text{g}$ 씩 Exogene 500(MBI Fermentus 사, 미국)을 이용하여 형질도입하였다. 유전자도입 36시간 후에 설파살라진 1.3mM을 첨가하고, 유도된 세포사멸 조건을 극복할 수 있는지 여부를 확

인하였다. 설파살라진 첨가 120시간 후 세포관찰 결과, 항산화 유전자를 도입하지 않은 대조군(pMYK-eGFP)의 경우 100% 세포사멸이 관찰된 반면, 항산화 유전자를 도입한 실험군들(GPx, PrxII 및 PrxIII)에서는 세포사멸이 부분적으로 억제되어 세포콜로니가 형성되고 있는 것이 관찰되었다. 형성된 세포콜로니에 대해 0.5% 크리스탈 바이올렛(소화화학, 동경, 일본)으로 콜로니 염색을 수행하여 콜로니 형성정도를 확인하였다(도 6 참조).

69> PrxII 유전자가 도입되어 세포사멸을 억제하는 세포군에서는 PrxII 단백질이 과발현되는 것을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다(도 7 참조).

70> 대조군에 비해 항산화 유전자를 도입한 실험군들에서 세포콜로니가 형성되는 결과는 항산화 유전자(GPx, PrxII 및 PrxIII)의 과발현에 의해 HBx를 발현하는 Chang X31 간세포주의 세포사멸이 억제될 수 있음을 의미하며, 상기 방법으로 선별된 유전자는 바이러스성 간염의 증상을 완화시키거나 간암세포 발생에 기여하는 유전자 후보가 되어 간염 및 간암의 예방 및 치료에 이용될 수 있을 것이다.

【발명의 효과】

71> 본 발명의 방법을 이용함으로써 세포배양 상에서 B형 간염 바이러스에 감염된 간세포의 완전한 사멸을 유도할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 간세포의 완전한 사멸 유도방법을 이용하여 간세포의 사멸을 억제하는 물질 및 유전자를 탐색할 수 있으므로, 본 발명에 따른 방법은 간염 치료제 및 유전자 치료제를 개발하는데 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

NF- κ B 억제제를 처리하는 것을 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 세포사멸을 유도시키는 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

HBx 단백질을 발현하는 간세포가 세포주 Chang X31인 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

NF- κ B 억제제가 설파살라진(sulfasalazine)인 방법.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서,

1.3mM 이상의 설파살라진을 처리하여 처리 후 120시간 이내에 간세포의 완전한 세포사멸을 유도하는 방법.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

1.3mM 내지 2.0mM의 설파살라진을 처리하는 방법.

【청구항 6】

하기 단계를 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸을 억제하는 물질을 탐색하는 방법:

- 1) HBx 단백질을 발현하는 간세포의 배양 배지에 NF- κ B 억제제를 처리하기 이전 또는 이후에 간세포의 세포사멸 억제 후보 물질을 처리하는 단계; 및
- 2) 세포사멸의 억제 여부를 확인하는 단계.

【청구항 7】

하기 단계를 포함하는, HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸을 억제하는 유전자를 탐색하는 방법:

- 1) HBx 단백질을 발현하는 간세포에 후보 유전자를 도입하는 단계;
- 2) 1)에서 얻은 세포의 배양 배지에 NF- κ B 억제제를 처리하는 단계; 및
- 3) 세포사멸의 억제 여부를 확인하는 단계.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서,

단계 1)에서 후보 유전자의 도입은 레트로바이러스 cDNA 라이브러리를 이용하거나 발현벡터를 이용하는 방법.

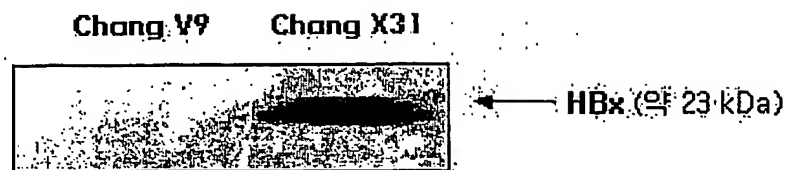
【청구항 9】

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,

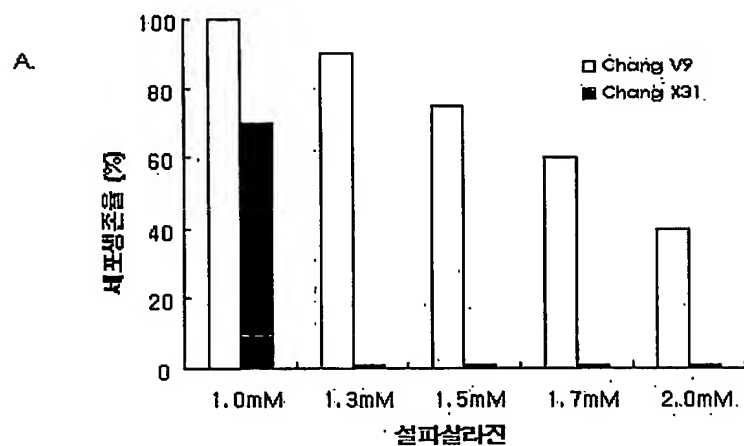
NF- κ B 억제제가 설파살라진(sulfasalazine)인 방법.

【도면】

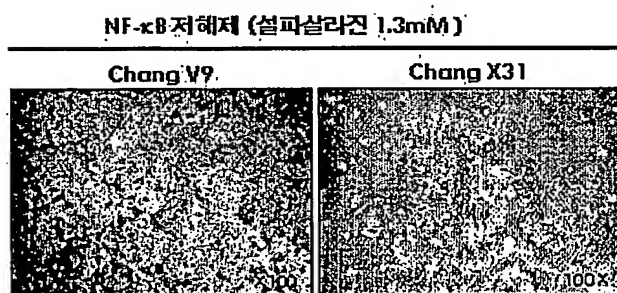
【도 1】



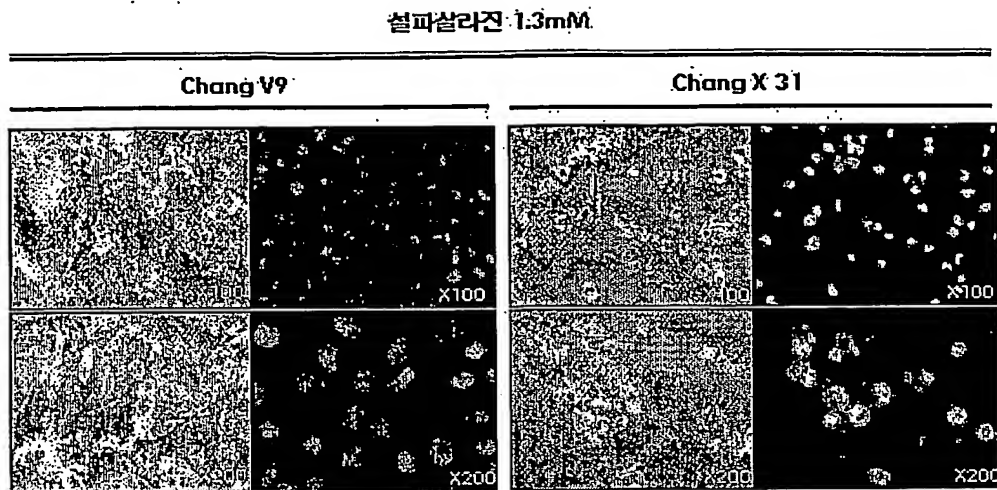
【도 2】



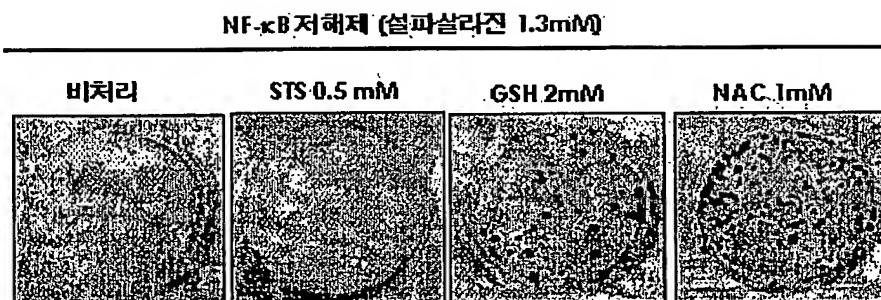
B.



【도 3】



【도 4】

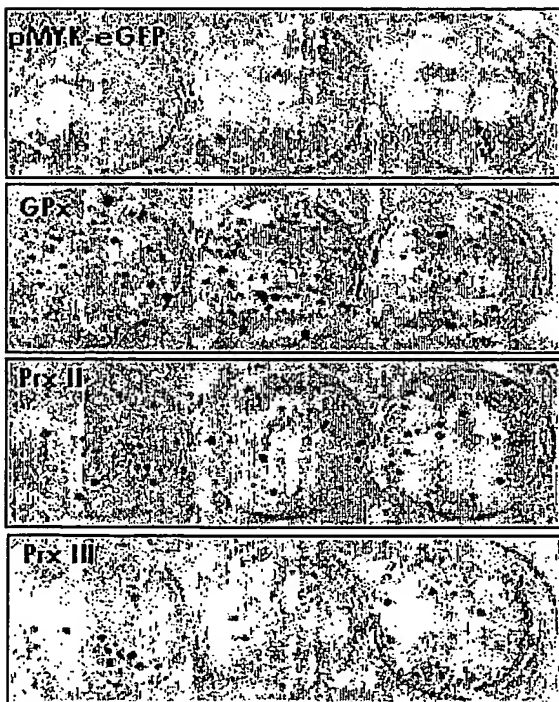


【도 5】



【도 6】

NF- κ B 저해제 (설파살라진 1.3mM)



【도 7】

